



TITLE:

スプライシングを利用したボルナ 病ウイルスの遺伝子発現制御機構 の研究(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

小嶋, 将平

CITATION:

小嶋, 将平. スプライシングを利用したボルナ病ウイルスの遺伝子発現
制御機構の研究. 京都大学, 2019, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2019-03-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21930>

RIGHT:

(続紙 1)

京都大学	博士（生命科学）	氏名	小嶋 将平
論文題目	スプライシングを利用したボルナ病ウイルスの遺伝子発現制御機構の研究		
(論文内容の要旨)			
<p>ウイルスは、その限られた長さのゲノムより、機能の異なる多くのタンパク質を発現する仕組みを持っている。ボルナ病ウイルス(Borna disease virus: BoDV)は、ヒトを含む多くの哺乳動物に感染する非分節型 1 本鎖マイナス鎖 RNA ウイルスである。約 9.8-kb の BoDV ゲノムには、少なくとも 6 つの ORF があり、それぞれに異なるタンパク質をコードしている。しかしながら、BoDV ゲノムが、これら 6 つのタンパク質以外に、どのようなタンパク質を発現しているのかについてはこれまでにほとんど明らかにされていなかった。</p> <p>本研究では、まず次世代シーケンスを用いた BoDV mRNA の網羅的な配列解析を行うことで、BoDV の新たな転写産物の有無について検討を行った。その結果、BoDV のヌクレオプロテイン(N) mRNA 内に 2 つのイントロンが存在することが明らかとなり、RNA スプライシングを受けた N mRNA が発現していることが示された。BoDV の N はウイルスゲノム RNA に結合し、ウイルスゲノムの転写・複製を制御する RNA 結合タンパク質である。これまでの研究から、N mRNA からは、翻訳開始部位の異なる 2 種類のアイソフォーム(N、N')が発現していることが報告されていた。新たに発見した RNA スプライシングにより発現する 4 種類の N アイソフォームは、N と共通の読み枠を維持する部分欠損型タンパク質を発現すると考えられた。そこで、組換え N アイソフォームを作製し、その発現と細胞内局在の解析を行った。その結果、4 種類の N アイソフォームは、それぞれに核内、細胞質そして小胞体などの多様な細胞内局在を示すことが明らかとなった。また、BoDV 感染培養細胞において、一部の N アイソフォームが発現することも確認された。</p> <p>そこで、これら N アイソフォームの細胞内局在を制御する分子機構を明らかにするために、各アイソフォームの欠損変異体作製と立体構造予測解析を行った。その結果、N アイソフォームの多様な細胞内局在は、翻訳開始部位とスプライシングによるコード領域の欠損や立体構造の変化による細胞内局在シグナルのタンパク質表面への露出により制御されていることが明らかとなった。</p> <p>次に、N アイソフォームの機能を解明するために、BoDV のミニゲノムアッセイを行い、ウイルス転写への影響を検討した。その結果、N アイソフォームはウイルスポリメラーゼの転写活性を有意に減少させることが明らかとなった。また、スプライシングシグナルに同義変異を加えた変異型組換え BoDV を作製し、野生型ウイルスと感染性比較を行ったところ、変異型組換え BoDV は培養細胞内での感染の広がりが早く、スプライシングより発現される N アイソフォームがウイルス感染を負に制御している可能性が示された。</p> <p>以上の結果から、BoDV が宿主の RNA スプライシング機構を利用することで、細胞内局在の異なる多様な N アイソフォームを発現し、それらがウイルス感染の制御に寄与していることが明らかとなった。RNA スプライシングは、比較的短いゲノムを持つ RNA ウイルスにおいて、ウイルスタンパク質の配列や構造を変化させることで機能の異なる多様なタンパク質を発現するひとつの有用な方法であると考えられた。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、ボルナ病ウイルス(BoDV)の N 遺伝子が、その発現において RNA スプライシング機構を用いることで細胞内局在の異なる多様なアイソフォームを発現し、ウイルス複製の制御を行っていることを示した論文である。

RNA ウイルスは、その短いゲノムから多様な遺伝子産物を発現するために様々な転写翻訳機構を獲得してきた。BoDV は、約 9.8-kb の一本鎖 RNA ゲノムに 6 つの ORF をコードしているが、それぞれの ORF からどのようなアイソフォームが発現しているのかについては、詳細には解明されていなかった。本研究では、次世代シーケンスを用いて BoDV の転写産物を解析することで、N 遺伝子内に新たなスプライシングイントロンを 2 カ所発見した。そして、スプライシングと翻訳開始部位の選択により発現される数種類の N アイソフォームが、それぞれに核内、細胞質そして小胞体などの多様な細胞内局在を示すことを明らかにした。また、BoDV 感染培養細胞で、一部の N アイソフォームが発現していることも確認した。さらに、N アイソフォームの立体構造予測解析により、スプライシングによるコード領域の欠損や立体構造の変化が細胞内局在を制御している可能性を示した。加えて、新しく発見された N アイソフォームが BoDV のポリメラーゼ活性を有意に減少させること、そしてスプライシング部位に変異を加えた組換え BoDV では、培養細胞内での感染の広がりが早いことを示し、スプライシングより発現される N アイソフォームが BoDV の感染を負に制御している可能性を示した。

以上の結果は、BoDV が宿主の RNA スプライシング機構を利用することで、細胞内局在の異なる多様なアイソフォームを発現し、ウイルス感染を制御していることを明らかにしたものであり、RNA スプライシングが機能の異なるタンパク質を発現する有用な方法であることを示したものである。これまで、BoDV のタンパク質発現機序に関しては不明な点が多く、その制御機構も明らかにされていなかった。この論文において、申請者はそのメカニズムの一端を明らかにすることに成功している。

本論文はウイルス学に関する高度で幅広い学識と優れた研究能力を示している。また生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見や概念を提示している。よって、本論文は博士（生命科学）の学位論文としての価値あるものと認めた。さらに平成31年2月5日に公聴会を実施し、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 平成 年 月 日